ChinaXiv合作期刊

脂肪酸对奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白和乳脂合成相关基因表达量的影响

张　花　李大彪* 邢媛媛　孙　梅

(内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018)

摘　要：本试验旨在探寻促进奶牛乳腺上皮细胞(BMECs)乳蛋白和乳脂合成的短链脂肪酸(乙酸、β-羟丁酸)和长链脂肪酸（油酸、亚油酸、亚麻酸）的组合添加模式，为调控乳成分合成提供理论依据。BMECs 经分离、纯化后，选取第 2 代细胞，分为 5 组，对照组不添加脂肪酸，Ⅰ组和Ⅱ组添加的乙酸、β-羟丁酸浓度比例均为 2.0（9.60 mmol/L）∶1.0（4.80 mmol/L），油酸、亚油酸、亚麻酸的浓度比例分别为 2.0（17.30 μmol/L）∶13.3（115.05 μmol/L）∶1.0（8.65 μmol/L）和 9.6（75.20 μmol/L）∶7.4(58.00 μmol/L)∶1.0(7.80 μmol/L)；Ⅲ组和Ⅳ组添加的乙酸、β-羟丁酸的浓度比例均为 1.0(7.20 mmol/L)∶1.0(7.20 mmol/L)，油酸、亚油酸、亚麻酸的浓度比例分别为 2.0∶13.3∶1.0 和 9.6∶7.4∶1.0，各组添加的短链脂肪酸(SCFA)和长链脂肪酸(LCFA)总浓度为 14.541 mmol/L，每组 3 个重复。培养 24 h 后，检测细胞相对增殖率（RGR）、甘油三酯(TAG)的合成量以及乳蛋白和乳脂合成相关基因的表达量。结果表明：1）试验组 BMECs RGR 及 TAG 的合成量均显著高于对照组($P < 0.05$)；Ⅰ组 RGR 最高，TAG 合成量最多。2）与对照组相比，Ⅱ组显著提高了核糖体蛋白 S6 激酶 1（*S6K*1）、κ-酪蛋白(*CSN*3)基因的表达量($P < 0.05$)；Ⅳ组显著提高了真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1（4*EBP*1）基因的表达量($P < 0.05$)；试验组信号转导和转录激活因子 5（*STAT*5）基因的表达量显著降低($P < 0.05$)。3）与对照组相比，试验组二酰甘油酰基转移酶 2(*DGAT*2)基因的表达量显著提高($P < 0.05$)，脂肪酸合成酶（*FASN*）基因的表达量显著降低($P < 0.05$)。综上所述，在培养液中添加 7.20 mmol/L 乙酸、7.20 mmol/L β-羟丁酸、75.20 μmol/L 油酸、58.00 μmol/L 亚油酸、7.80 μmol/L 亚麻酸对 BMECs 乳蛋白和乳脂合成相关基因的表达量有较好的促进作用。

关键词：奶牛乳腺上皮细胞；短链脂肪酸；长链脂肪酸；乳蛋白；乳脂

中图分类号：S823

乳蛋白和乳脂是牛奶质量的关键指标。乙酸和 β-羟丁酸来源于瘤胃发酵，它们是奶牛乳腺上皮细胞(bovine mammary epithelial cells,BMECs)脂肪酸从头合成的的主要前体物，约 50%的 C16 脂肪酸和长链脂肪酸(long chain fatty acids,LCFA)来源于饲料中和体脂分解[1]。孔

chinaXiv:201711.01763v1

chinaXiv:201711.01763v1

庆洋[2]在 BMECs 中添加乙酸和 β-丁酸，结果表明提高了乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）和脂肪酸合成酶（*FASN*）基因的表达量及甘油三酯(triglyceride，TAG)的合成量，同时也提高了哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（*mTOR*）和二酰甘油酰基转移酶 2(*DGAT*2)基因的表达量。梁梦瑶等[3]研究结果表明，低浓度的油酸促进 BMECs *ACC* 和 *FASN* 基因的表达，进而促进乳脂的合成。李红磊[4]研究表明，当油酸、亚油酸、亚麻酸的浓度分别为 2（22.20 μmol/L）：13.3（147.70 μmol/L）：1（11.10 μmol/L）时，上调了 BMECs αS1-酪蛋白(*CSN*1*S*1)、κ-酪蛋白(*CSN*3)和 *mTOR* 基因的表达量。由此可见，在泌乳过程中，脂肪酸起到重要的调控作用，对乳蛋白和乳脂的合成具有重要影响。Mach 等[5]研究表明，饲粮中添加油菜籽、大豆、亚麻籽后，乳脂和乳蛋白的含量下降，产奶量增加。因此，可以假设乳脂合成前体物（MFP）中不饱和脂肪酸的比例可以调节乳脂合成。综观国内外文献报道，在牛奶的分泌机制和营养调控乳成分含量方面取得了一些进展，但是营养素调控乳蛋白、乳脂合成分子生物学机制和信号转导途径仍然不清楚。单一脂肪酸的添加对 BMECs 乳蛋白和乳脂合成影响的研究最多，而短链脂肪酸(short chain fatty acids，SCFA)和 LCFA 的混合添加对 BMECs 乳成分合成影响的研究较少。因此，本试验混合添加不同比例的乙酸、β-羟丁酸、油酸、亚油酸、亚麻酸，研究其对 BMECs 乳蛋白和乳脂合成相关基因表达量的影响，旨在探寻促进乳蛋白和乳脂合成的脂肪酸组合添加模式，为调控乳成分合成提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　BMECs 的分离与纯化

选取体况良好、处于泌乳高峰期的中国荷斯坦奶牛进行乳腺组织取样，剪取含有大量腺泡的乳腺组织约 55 g 放于含有双抗的磷酸盐缓冲液（PBS）中，通过 II 型胶原酶消化获得原代 BMECs。放于 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱中培养原代细胞，大约 1 周细胞长满培养瓶底部的 80%左右时，利用胰酶对成纤维上皮细胞和乳腺上皮细胞的消化时间不同来纯化 BMECs 并传代。以第 2 代的 BMECs 为试验对象。

1.2　试验培养基

试验培养基为添加氢化可得松、谷氨酰胺、胰岛素-转铁蛋白-硒钠、催乳素的 DMEM/F12 的培养基，试剂均购自 GIBCO 公司。

1.3　试验设计

本试验采用单因素完全随机试验设计。脂肪酸添加浓度比例参考李红磊[4]和塔娜等[6]的研究结果设置，当乙酸：β-羟丁酸的浓度比例为 2.0：1.0、油酸：亚油酸：亚麻酸的浓度比例为 2.0：13.3：1.0 时，对乳脂合成相关基因的表达有较好的促进作用；当乙酸：β-羟丁酸的浓度比例为 1.0：1.0、油酸：亚油酸：亚麻酸的浓度比例为 9.6：7.4：1.0 时，对乳蛋白合成相关基因的表达有较好的促进作用。因此，根据 SCFA（乙酸、β-羟丁酸，2 者总添加量为 14.4 mmol/L）和 LCFA（油酸、亚油酸、亚麻酸，总添加量为 141 μmol/L）的总添加量相同，各脂肪酸间的比例不同，交叉设计了 5 组，试验设计见表 1。

表 1　试验设计

Table 1　Experimental design

目 Items	对照 Control	组别 Groups I	II	III	IV
酸：β-羟丁酸 Acetic acid：β-hydroxybutyric acid		2.0：1.0	2.0：1.0	1.0：1.0	1.0：1.0
酸：亚油酸：亚麻酸 Oleinic acid：linoleic acid：linolenic acid		2.0：13.3：1.0	9.6：7.4：1.0	2.0：13.3：1.0	9.6：7.4：1.(
酸 Acetic acid/(mmol/L)		9.60	9.60	7.20	7.20
羟丁酸 β-hydroxybutyric acid/(mmol/L)		4.80	4.80	7.20	7.20
酸 Oleinic acid/(μmol/L)		17.30	75.20	17.30	75.20
油酸 Linoleic acid/(μmol/L)		115.05	58.00	115.05	58.00
麻酸 Linolenic acid/(μmol/L)		8.65	7.80	8.65	7.80

1.4　测定指标与方法

1.4.1　细胞活力的检测

采用四甲基偶氮唑盐(thiazoly blue tetrazolium bramide,MTT)比色法检测 BMECs 的细胞活力。每孔接种细胞悬浮液的密度为 1×10^4 个，将 96 孔板置于培养箱中培养细胞生长至培养瓶底部的 80%左右时，添加不同浓度比例的乙酸、β-羟丁酸、油酸、亚油酸、亚麻酸的诱导培养基，放置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，每组均设 3 个重复；培养结束前 4 h，每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μL；待 4 h 后弃上清，每孔加入二甲基亚砜（DMSO）100 μL，振荡 10 min 后，用全自动酶标仪检测 490 nm 下吸光光度值($OD_{490\ nm}$)。

相对增殖率(relative growth rate，RGR)=试验组 $OD_{490\ nm}$/对照组 $OD_{490\ nm}$。

1.4.2　TAG 合成量的测定

接种第 2 代 BMECs 悬浮液于 75 cm^2 培养瓶中，每瓶吸取 10 mL 细胞悬浮液，每瓶细胞约为 8×10^5 个，放置在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养细胞生长至培养瓶底部的 80%左右

chinaXiv:201711.01763v1

chinaXiv:201711.01763v1

时，添加不同乙酸、β-羟丁酸、油酸、亚油酸、亚麻酸浓度比例的诱导培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中继续培养 24 h，每组均设 3 个重复，用胰蛋白酶/乙二胺四乙酸（EDTA）将细胞消化后离心 8 min，弃上清，用 PBS 清洗 1 次，采用 TAG 试剂盒检测 BMECs 内 TAG 的合成量。

1.4.3　乳蛋白和乳脂合成相关基因表达量

将第 2 代的 BMECs 置于 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱中培养待细胞，长满约 70%时，添加不同浓度比例的乙酸、β-羟丁酸、油酸、亚油酸、亚麻酸的诱导培养基，每组设 3 个重复，培养 24 h 后，收集细胞，提取 RNA（试剂盒为 RNA isoplus），反转录（试剂盒为 prime script^{TM} RT reagent kit），应用 RT-qPCR 法（试剂盒购自 TaKaRa 公司），检测乳蛋白合成的相关基因(*CSN1S1*、*CSN3*)、信号通路相关基因[*mTOR*、转录激活因子 5（*STAT5*）、真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1（4*EBP1*）、核糖体蛋白 S6 激酶 1（*S6K1*）、蛋白激酶 B（*AKT*)]、乳脂合成的相关基因(*ACC*、*FASN*、*DGAT2*)、乳脂合成相关转运调控因子[过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (*PPARγ*)、固醇调节原件结合蛋白 1（*SREBP1*)]的表达量。试验重复 3 次。本试验甘内参基因为油醛-3-磷酸脱氢酶（*GAPDH*）。引物序列及参数见表 2。各基因表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示[6]。

表 2　引物序列及参数

Table 2　Primer sequences and parameters

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5′-3′)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
甘油醛脱氢酶	F：5′-GTTTGTGATGGGCGTGAAC-3′	XM-001034034.1
GAPDH	R：5′-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3′	
αS1-酪蛋白	F:5′-TTCCCTCTTTCATACTGTGAAGTCGT-3′	NM_181029.2
CSN1S1	R：5′-GGCTATGGCTCCTAAGCACA-3′	
κ-酪蛋白	F：5′-CCAGCTGCAGTTAGGTCAC-3′	NM_174294.
CSN3	R：5′-GGTGGAATGGCCATAAATGAT-3′	
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白	F：5′-TGTGGAGTTTGAGGTGAAGC-3′	XM_002694043.1
mTOR	R：5′-ATTATCAAAGAAGGGCTGCAC-3′	
信号转导和转录激活因子 5	F：5′-TGTGGAGTTTGAGGTGAAGC-3′	NM_001012673
STAT5	R：5′-ATTATCAAAGAAGGGCTGCAC-3′	
蛋白激酶 B *AKT*	F：5′-CCTGCTCTCTGGGCTACTCAA-3′	NM_005163
	R：5′-CACGATGCTGGCGAAGAA-3′	
真核翻译起始因子 4E 结合	F：5′-GAACTCACCTGTGACCAAGA-3′	BC120290.1
蛋白 1 4*EBP1*	R：5′-CTCAAACTGTGACTCTTCACC-3′	
核糖体蛋白 S6 激酶 1	F：5′-ATGAAAGCATGGACCATGGG-3′	NM.205816.1

ChinaXiv合作期刊

*S6K*1	R：5′-CCGGTATTTGCTCCTGTTAC-3′	
乙酰辅酶 A 羧化酶	F：5′-GTTTGTGATGGGCGTGAACC-3′	NM_174224
ACC	R：5′-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3′	
脂肪酸合成酶	F：5′-GTTTGTGATGGGCGTGAACC-3′	NM_001012699
FASN	R：5′-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3′	
二酰甘油酰基转移酶 2	F：5′-CATGAAGACCCTCATAGCCG-3′	NM_205793
*DGAT*2	R:：5′-ACCAGCCAGGTGAAGTAGAGC-3′	
过氧化物酶体增殖物激活受	F：5′-ATGTCTCATAATGCCATCAGGTT-3′	NM_181024
体 γ *PPARγ*	R：5′-GATAACAAACGGTGATTTGTCTGTC-3′	
固醇调节原件结合蛋白 1	F:5′-CGCTCTTCCATCAATGACAA-3′	NM_001113302
*SREBP*1	R:5′-TTCAGCGATTTGCTTTTGTG-3′	

F:上游引物；R:下游引物。

F: forward primer; R: reverse primer.

1.5 数据统计与分析

采用 Excel 2007 进行计算和整理试验数据，实时定量 PCR 试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行相对定量数据分析。利用 SAS 9.0 软件的 ANOVA 程序对数据进行方差分析，P<0.05 表示差异显著。

2 结 果

2.1 不同浓度比例脂肪酸对 BMECs RAG 和 TAG 合成量的影响

由表 3 可知，试验组 BMECs 的 RGR 和 TAG 合成量都显著高于对照组（P < 0.05）。Ⅰ组 RGR 和 TAG 合成量显著高于其他试验组（P < 0.05），Ⅱ组和Ⅳ组显著高于Ⅲ组（P < 0.05），Ⅱ组和Ⅳ组之间无显著差异（P > 0.05）。

表 3 不同浓度比例脂肪酸对 BMECs RAG 和 TAG 合成量的影响

Table 3 Effects of different concentrations of fatty acids on RAG and TAG synthesis amount in BMECs (n=3)

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
相对增殖率 RGR	1.00±0.01[d]	1.65±0.02[a]	1.40±0.01[c]	1.59±0.01[b]	1.37±0.01[c]
甘油三酯 TAG	0.02±0.01[d]	0.33±0.04[a]	0.11±0.02[c]	0.17±0.04[b]	0.11±0.02[c]

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（P < 0.05），相同或无小写字母表示差异不显著（P > 0.05）。下表同。

Values in the same row with different small letter superscripts mean significant difference (P < 0.05), while with the same or no small letter superscripts mean no significant difference (P > 0.05). The same as below.

2.2 不同浓度比例的脂肪酸对 BMECs 乳蛋白合成相关基因表达量的影响

chinaXiv:201711.01763v1

chinaXiv:201711.01763v1

由表 4 可知，与对照组相比，Ⅰ组显著降低了 BMECs *CSN1S1*、*CSN3* 和 *STAT5* 基因的表达量($P < 0.05$)，而 *mTOR* 和 *4EBP1* 基因表达量显著提高（$P < 0.05$）；Ⅱ组、Ⅲ组和Ⅳ组显著上调了 *CSN3* 和 *S6K1* 基因的表达量($P < 0.05$)，而 *STAT5* 基因表达量显著降低($P < 0.05$)；Ⅲ组和Ⅳ组 *AKT* 和 *4EBP1* 基因的表达量显著提高（$P < 0.05$）；Ⅱ组 *mTOR* 和 *4EBP1* 基因的表达量显著降低($P < 0.05$)。

表 4　不同浓度比例的脂肪酸对 BMECs 乳蛋白合成相关基因表达量的影响

Table 4　Effects of different concentrations of fatty acids on expression levels of genes involved in milk protein synthesis in BMECs

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
αs1 酪蛋白 *CSN1S1*	1.00±0.18[ab]	0.26±0.13[c]	0.42±0.19[bc]	0.46±0.21[bc]	1.30±0.38[a]
κ-酪蛋白 *CSN3*	1.00±0.08[d]	0.40±0.02[e]	3.35±0.14[a]	1.58±0.19[c]	2.98±0.22[b]
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 *mTOR*	1.00±0.32[c]	1.46±0.02[b]	0.77±0.36[d]	1.89±0.89[a]	0.71±0.12[d]
信号转导和转录激活因子 5 *STAT5*	1.00±0.06[a]	0.77±0.04[b]	0.78±0.09[b]	0.70±0.14[b]	0.50±0.03[c]
蛋白激酶 B *AKT*	1.00±0.24[c]	1.17±0.10[c]	1.24±0.15[c]	1.53±0.05[b]	2.05±0.15[a]
真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 *4EBP1*	1.00±0.17[c]	1.21±0.04[b]	0.03±0.00[d]	1.19±0.04[b]	1.47±0.04[a]
核糖体蛋白 S6 激酶 1 *S6K1*	1.00±0.09[d]	0.92±0.01[d]	3.41±0.11[a]	1.72±0.06[b]	1.58±0.01[c]

2.3　不同浓度比例的脂肪酸对 BMECs 乳脂合成相关基因表达量的影响

由表 5 可知，与对照组相比，Ⅱ组、Ⅲ组和Ⅳ组 *ACC* 和试验组 *DGAT2* 基因的表达量显著高于对照组（$P < 0.05$），Ⅲ组和Ⅳ组 *ACC* 基因的表达量显著高于Ⅰ组和Ⅱ组（$P < 0.05$），Ⅱ组显著高于Ⅰ组（$P < 0.05$），Ⅱ组和Ⅳ组 *DGAT2* 基因的表达量显著高于Ⅰ组和Ⅲ组（$P < 0.05$），Ⅲ组显著高于Ⅰ组（$P < 0.05$）；试验组 *FASN* 和 *SREBP1* 基因的表达量显著下降($P < 0.05$)；Ⅰ组 *PPARγ* 基因的表达量显著上升（$P < 0.05$），而其他试验组则显著降低($P < 0.05$)。

表 5　不同浓度比例的脂肪酸对 BMECs 乳脂合成相关基因表达量的影响

Table 5　Effects of different concentrations of fatty acids on expression levels of genes involved in milk fat synthesis in BMECs

项目 Items	组别 Groups				
	对照 Control	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
乙酰辅酶 A 羧化酶 *ACC*	1.00±0.19[d]	1.21±0.12[d]	1.86±0.17[c]	6.64±0.32[a]	5.42±0.10[b]
脂肪酸合成酶 *FASN*	1.00±0.03[a]	0.62±0.01[b]	0.21±0.00[d]	0.26±0.02[c]	0.08±0.00[e]
二酰甘油酰基转移酶 2 *DGAT2*	1.00±0.17[d]	2.53±0.11[c]	5.16±0.24[a]	3.34±0.23[b]	5.37±0.30[a]
固醇调节原件结合蛋白 1 *SREBP1*	1.00±0.02[a]	0.54±0.09[b]	0.61±0.13[b]	0.46±0.03[b]	0.53±0.06[b]
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ *PPARγ*	1.00±0.08[b]	2.10±0.04[a]	0.39±0.23[c]	0.53±0.02[c]	0.55±0.1[c]

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201711.01763v1

3 讨 论

3.1 不同浓度比例的脂肪酸对 BMECs 增殖的影响

脂肪酸是乳腺组织中的一种重要的营养素，对 BMECs 的生长增殖具有一定的作用。齐利枝等[7]研究表明,低浓度的乙酸对 BMECs 的增殖有较好的促进作用，而高浓度则抑制 BMECs 的增殖。孙晓菊[8]研究表明，当油酸的浓度为 50～400 μmo/L、亚油酸的浓度为 25～100 μmol/L 时，对 BMECs 的增殖有促进作用，但是当油酸和亚油酸的浓度分别达到 800 和 200 μmol/L 时，BMECs 的增殖受到抑制；低浓度的亚油酸促进 BMECs 的增殖，而高浓度则表现出抑制作用。Yonezawa 等[9]研究表明，当油酸和亚油酸的浓度为 100 μmol/L 时，促进 BMECs 的增殖。有研究表明，当油酸浓度高于 0.20 mmol/L 时，细胞增殖受到了抑制[10-11]。AKT 有助于细胞的存活和增殖[12]。本试验中，*AKT* 基因的表达量与 RGR 的变化一致,相关作用机理有待进一步研究。

3.2 不同浓度比例的脂肪酸对 BMECs 乳蛋白合成相关基因表达量的影响

Janus 激酶 2(JAK2)/STAT5 信号通路的主要调控机制是结合在受体上的 STAT5 被 JAK 磷酸化修饰，靶基因与以二聚体的形式进入细胞核的活化 STAT5 结合，从而调控基因的转录水平[13]。Bionaz 等[14]的研究发现，泌乳阶段 *STAT*5 和 Janus 激酶（*JAK*）的基因表达量没有显著变化，表明 JAK/STAT5 对乳蛋白合成的调节有较小的影响作用。本试验中，试验组 *STAT*5 基因表达量均显著低于对照组，Ⅲ组和Ⅳ组 4*EBP*1 和 *S*6*K*1 基因表达量显著高于对照组，而且 *STAT*5 基因表达量的变化规律与 *CSN*1*S*1 和 *CSN*3 的基因表达量并不一致，这提示乳蛋白基因表达量的变化是 mTOR 信号通路和 JAK2/STAT5 信号通路综合作用的结果。*CSN*1*S*1、*CSN*3 是 2 个主要的酪蛋白基因，其对 BMECs 乳蛋白的合成有很强的相关性[15]。CSNYonezawa 等[16]研究发现，当油酸和亚油酸的浓度为 400 μmol/L 时，对 *CSN*1*S*1 的基因表达量有促进作用。Pauloin 等[17]研究表明，在鼠的乳腺上皮细胞中添加不饱和脂肪酸降低 *CSN*3 基因的表达量。本试验研究得出，对于 *CSN*1*S*1 基因的表达量，Ⅳ组高于对照组，但差异不显著，Ⅱ组 *CSN*3 基因的表达量最高，表明油酸、亚油酸、亚麻酸的浓度比例为 9.60∶7.4∶1.0 时，对 *CSN*1*S*1、*CSN*3 基因的表达有显著的促进作用。mTOR 是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶[18-19]，除了内分泌信号外，mTOR 信号途径还能调节乳蛋白合成、细胞能量水平和乳腺氨基酸的利用[20]。此信号通路上游受到 AKT 磷酸化的正调节，下游可促进

ChinaXiv合作期刊

S6K1 和 4EBP1 的磷酸化调节翻译起始，下游的这 2 条通路是 2 条平行的信号通路，各自控制特定亚基的 mRNA 翻译过程[21]；同时 SREBP1 作用的靶基因 *ACC* 和 *FASN* 的表达受到 mTOR 信号通路的抑制，表明 mTOR 参与了脂肪酸的从头合成[22]。本试验研究得出，Ⅰ组和Ⅲ组的 *mTOR*、*AKT* 和 4*EBP*1 基因表达量均显著高于对照组，说明油酸、亚油酸、亚麻酸的浓度比例为 2.0∶13.3∶1.0 时，上调了 *mTOR*、*AKT*、4*EBP*1 和 *S6K*1 基因的表达量，乙酸、β-羟丁酸浓度比例为 2.0∶1.0 时，对 *S6K*1 基因的表达有抑制作用。混合脂肪酸调控 BMECs 的机理有待进一步研究。

3.3 不同浓度比例的脂肪酸对 BMECs 乳脂合成相关基因表达量及 TAG 合成量的影响

AKT 与 mTOR 2 条信号通路不仅调控乳蛋白合成相关基因的表达，同时促进固醇调节原件结合蛋白（SREBP）信号转导，并进一步调控其靶基因 *ACC*、*FASN* 的表达从而影响乳脂的合成，*ACC* 和 *FASN* 是乳脂从头合成中 2 个重要的基因[23]。Ma 等[24]研究表明，BMECs 中添加 100 nmol/L，*SREBP*1 的 siRNA、*ACC* 和 *FASN* 的 mRNA 水平下降。本试验结果得出，试验组 *AKT* 和 *ACC* 基因的表达量显著高于对照组，下调了 *FASN* 和 *SREBP*1 基因的表达量，这表明加入混合脂肪酸后，AKT 信号通路负反馈调节 SREBP1，SREBP1 正反馈调节 FASN, 负反馈调节 ACC。大量的研究表明，SREBP1 和 PPARγ 是调节乳脂合成相关基因重要的核受体和转录调控因子，而且 PPARγ 可能参与调控 *SREBP*1 基因的表达。在脂肪合成细胞调控因子通路中 PPARγ 处于枢纽位置，可以通过影响脂肪酸的摄取、转运、从头合成和酯化过程从而调控基因的表达[25]。本试验得出，Ⅰ组 *PPARγ* 基因表达量高于对照组，其他组低于对照组，从而证明 PPARγ 可能参与了 SREBP1 的调控，同时受到 AKT 和 mTOR 的调控。在内质网 DGAT2 是一种完整的细胞微粒体酶，在催化 TAG 合成的过程中发挥着重要作用，在 TAG 合成过程中，它是唯一的限速酶[26]。本试验得出，Ⅱ组和Ⅳ组 *DGAT*2 基因的表达量都高于对照组，且其 TAG 合成量也显著高于对照组，这表明 DGAT2 对 TAG 的合成具有调控作用。乳脂大部分由 TAG 组成，来源于 BMECs 的乳糜微粒，TAG 的合成量可以直接反映 BMECs 乳脂的合成状况。脂肪酸通过上述信号通路的调节合成 TAG。崔瑞莲[27]研究指出，BMECs 的活力不受抑制的条件下（脂肪酸添加浓度为 0～10 μmol/L），TAG 的合成与各十八碳脂肪酸添加浓度呈正相关。塔娜等[6]研究表明，适宜的乙酸和 β-羟丁酸的浓度比例（2.0∶1.0 和 4∶1）对 BMECs 中 TAG 的合成和乳脂合成相关基因的表达有较好的促进作

chinaXiv:201711.01763v1

用。Shng 等[28]研究指出，油酸、亚油酸和亚麻酸的添加浓度比例为 2.0∶13.3∶1.0 时对 BMECs 的 TAG 合成有较好的促进作用。本试验结果表明，试验组 TAG 合成量显著高于对照组，表明添加适宜浓度比例的混合脂肪酸对 BMECs 内 TAG 的合成有促进作用。

4 结 论

乙酸、β-羟丁酸、油酸、亚油酸、亚麻酸的浓度分别为 7.20 mmol/L、7.20 mmol/L、75.20 μmol/L、58.00 μmol/L、7.80 μmol/L 时，提高了 *CSN*1*S*1、*CSN*1、*AKT*、4*EBP*1、*S*6*K*1、*DGAT*2 基因的表达量，对 BMECs 乳蛋白和乳脂的合成有较好的促进作用。

参考文献：

[1] KALAČ P,SAMKOVÁ E.The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat:a review[J].Czech Journal of Animal Science,2010,55(12):521–537.

[2] 孔庆洋.乙酸钠和丁酸钠对奶牛乳腺上皮细胞及腺泡乳脂合成相关基因表达的影响[D].硕士学位论文.哈尔滨:东北农业大学,2012.

[3] 梁梦瑶,高学军,侯晓明,等.油酸和硬脂酸对奶牛乳腺上皮细胞中脂肪酸结合蛋白 3 表达和脂滴分泌的影响[J].中国畜牧兽医学报,2014,41(5):137–141.

[4] 李红磊.二、三维培养模式下添加十八碳不饱和脂肪酸对奶牛乳腺上皮细胞乳成分合成的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2016.

[5] MACH N,JACOBS A A A,KRUIJT L,et al.Alteration of gene expression in mammary gland tissue of dairy cows in response to dietary unsaturated fatty acids[J].Animal,2011,5(8):1217–1230.

[6] 塔娜,李红磊,侯先志,等.乙酸钠和 β-羟丁酸钠对奶牛乳腺上皮细胞乳脂和乳蛋白合成相关基因表达的影响[J].动物营养学报,2014,26(6):1527–1534.

[7] 齐利枝,闫素梅,生冉,等.乙酸对奶牛乳腺上皮细胞活力及 *CD*36 和 *FABP*3 基因表达的影响[J].饲料工业,2013(11):49-52.

[8] 孙晓菊.十八碳不饱和脂肪酸对乳腺上皮细胞脂肪代谢的影响及其机制研究[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.

[9] YONEZAWA T,SANOSAKA M,HAGA S,et al.Regulation of uncoupling protein 2 expression by long-chain fatty acids and hormones in bovine mammary epithelial cells[J].Biochemical and Biophysical Research Communications,2008,375(2):280–285.

chinaXiv:201711.01763v1

[10] VINCIGUERRA M,CARROZZINO F,PEYROU M,et al.Unsaturated fatty acids promote hepatoma proliferation and progression through downregulation of the tumor suppressor PTEN[J].Journal of Hepatology,2009,50(6):1132–1141.

[11] VOCK C,GLEISSNER M,KLAPPER M,et al.Oleate regulates genes controlled by signaling pathways of mitogen-activated protein kinase,insulin and hypoxia[J].Nutrition Research,2008,28(10):681–689.

[12] CHEN C C,BOXER R B,STAIRS D B,et al.AKT is required for STAT5 activation and mammary differentiation[J].Breast Canser,2010,12:R72.

[13] 李喜艳.奶牛乳腺上皮细胞中赖氨酸蛋氨酸配比模式对酪蛋白合成的影响及机理研究[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2011.

[14] BIONAZ M,LOOR J J.Gene networks driving bovine mammary protein synthesis during the lactation cycle[J].Bioinformatics and Biology Insights,2011,5:83–98.

[15] LEE G Y,KENNYY P A,LEE E H,et al.Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells[J].Nature Methods,2007,4(4):359–365.

[16] YONEZAWA T,YONEKURA S,KOBAYASHI Y.Effects of long-chain fatty acids on cytosolic triacylglycerol accumulation and lipid droplet formation in primary cultured bovine mammary epithelial cells[J].Journal of Dairy Science,2004,87(8):2527–2534.

[17] PAULOIN A,CHAT S,PÉCHOUX C,et al.Oleate and linoleate stimulate degradation of β-casein in prolactin-treated HC11 mouse mammary epithelial cells[J].Cell and Tissue Research,2010,340(1):91–102.

[18] LATRES E,AMINI A R,AMINI A A,et al.Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (P13K/Akt/mTOR) pathway[J].The Journal of Biological Chemistry,2005,280(4):2737–2744.

[19] LAPLANTE M,SABATINI D M.mTOR signaling at a glance[J].Journal of Cell Science,2009,122(20):3589–3594.

[20] BURGOS S A,DAI M,CANT J P.Nutrient availability and lactogenic hormones regulate

chinaXiv:201711.01763v1

chinaXiv:201711.01763v1

mammary protein synthesis through the mammalian target of rapamycin signaling pathway[J].Journal of Dairy Science,2010,93(1):153–161.

[21] 邢媛媛,李大彪,李红磊,等.催乳素对奶牛乳腺上皮细胞乳脂和乳蛋白合成相关基因表达的影响[J].动物营养学报,2016,28(8):2439–2447.

[22] MA X M,BLENIS J.Molecular mechanisms of Mtor-mediated translational control[J].Nature Reviews Molecular Cell Biology,2009,10(5):307–318.

[23] BIONAZ M,LOOR J J.*ACSL*1,*AGPAT*6,*FABP*3,*LPIN*1,and *SLC*27*A*6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation[J].Journal of Dairy Nutrion,2008,138(6):1019–1024.

[24] MA L,CORL B A.Transcriptional regulation of lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells by sterol regulatory element binding protein-1[J].Journal of Dairy Science,2012,95(7):3743–3755.

[25] 崔瑞莲.十八碳脂肪酸对泌乳奶牛乳腺上皮细胞甘油三酯合成的影响及机理研究[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2012.

[26] YU Y H,GINSBERG H N.The role of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) in energy metabolism[J].Annals of Medicine,2004,36(4):252–261.

[27] THERING B J,BIONAZ M,LOOR J J.Long-chain fatty acid effects on peroxisome proliferator-activated receptor-α-regulated genes in Madin-Darby bovine kidney cells:optimization of culture conditions using palmitate[J].Journal of Dairy Science,2009,92(5):2027–2037.

[28] SHNG R,YANS M,QI L Z,et al.Effect of the ratios of unsaturated fatty acids on the expressions of genes related to fat and protein in the bovine mammary epithelial cells[J].Animal 2015,51(4):381–389.

Effects of Fatty Acids on Expression Levels of Genes Involved in Milk Protein and Milk Fat Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells

ZHANG Hua LI Dabiao* XING Yuanyuan SUN Mei

(*College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: The aim of this study was to explore combined supplemental model of short chain fatty

ChinaXiv合作期刊

acids (acetic acid, β-hydroxybutyric acid) and long chain fatty acids (oleic acid, linoleic acid, linolenic acid) to promote milk protein and milk fat synthesis in bovine mammary epithelial cells (BMECs)， to provide theoretical basis for the regulation of synthesis of milk composition. BMECs were separated and purified, and the second generation of cells was selected and divided into 5 groups with 3 replicates per group. No fatty acid was added in control group; in groups Ⅰ and Ⅱ, the concentration radio of supplied acetate acid and β-hydroxybutyric acid was 2.0 (9.60 mmol/L) : 1.0 (4.80 mmol/L), however, the concentration radio of oleic acid, linoleic acid and linolenic acid was 2.0 (17.30 μmol/L) : 13.3 (115.05 μmol/L) :1.0 (8.65 μmol/L) and 9.6 (75.20 μmol/L) : 7.4 (58.00 μmol/L) : 1.0 (7.80 μmol/L), respectively; in groups Ⅲ and Ⅳ, the concentration radio of acetate acid and β-hydroxybutyric acid was 1.0:1.0, however, the concentration radio of oleic acid, linoleic acid and linolenic acid was 2.0:13.3:1.0 and 9.6:7.4:1.0, respectively. The total concentration of short chain fatty acids and long chain fatty acids was 14.541 mmol/L. After cultured for 24 h, relative growth rate (RGR), triglyceride (TAG) synthesis amount and expression levels of genes involved in milk protein and milk fat synthesis. The results showed as follows: 1） RGR and TAG synthesis amount of BMECs in experimental groups were significantly higher as comparing with control group ($P < 0.05$); RGR and TAG synthesis amount were the highest in group Ⅰ. 2) Compared with control group, expression levels of ribosomal protein S6kinase (*S6K*1) and κ-casein (*CSN*3) genes in group Ⅱ were significantly increased ($P < 0.05$)； expression level of eukaryotic initiation 4E binding protein (4*EBP*1) gene in group Ⅳ was significantly increased ($P < 0.05$); expression level of signal transduction and transcriptional activation factor 5 (*STAT*5) gene in experimental groups was significantly decreased ($P < 0.05$). 3) Compared with control group, expression level of diacylgycerol acyltransferase 2 (*DGAT*2) gene in experimental groups was significantly increased ($P < 0.05$), and expression level of fatty acid synthase (*FASN*) gene was significantly decreased ($P < 0.05$). In conclusion, expression levels of genes involved in milk protein and milk fat synthesis has a better effect when culture medium is added with 7.20 mmol/L acetate acid, 7.20 mmol/L β-hydroxybutyric acid, 75.20 μmol/L oleic acid, 58.00 μmol/L linoleic acid, 7.80 μmol/L linolenic

chinaXiv:201711.01763v1

ChinaXiv合作期刊

acid.

Key words: bovine mammary;short chain fatty acid;long chain fatty acid;milk protein;milk fat

chinaXiv:201711.01763v1